



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05521
G01N 33/58, 33/533			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02102		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Juli 1998 (22.07.98)		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 8. April 1999 (08.04.99)	
(30) Prioritätsdaten: 197 31 741.3 23. Juli 1997 (23.07.97) DE		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SINN, Hannsjörg [DE/DE]; Ahornweg 10, D-69168 Wiesloch (DE). SCHRENK, Hans-Hermann [DE/DE]; Mittelgasse, D-67278 Zeiskamm (DE). WUNDER, Andreas [DE/DE]; Joh.-Seb.-Bach-Strasse 18, D-69214 Eppelheim (DE). STEHLE, Gerd [DE/DE]; Edinger Strasse 11, D-69123 Heidelberg (DE).			
(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: CONJUGATE FOR DIFFERENTIATING BETWEEN HEALTHY AND UNHEALTHY TISSUE

(54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR UNTERScheidUNG VON KRANKHAFTEM UND GESUNDEM GEWEBE

## (57) Abstract

The invention relates to conjugates, comprising a fluorescent compound and a carrier, wherein the compound and the carrier are connected via an acidic ester or an acidic amide bond and the compound has an excitation wavelength of 630 nm or more and/or 450 nm or less. The invention also relates to the production of said conjugates and to the use thereof.

## (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Konjugate, umfassend eine zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und einen Träger, wobei die Verbindung und der Träger über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung verbunden sind und die Verbindung eine Anregungswellenlänge von 630 nm oder größer und/oder 450 nm oder kleiner aufweist. Ferner betrifft die Erfindung die Herstellung solcher Konjugate sowie ihre Verwendung.

K 2575

EINGEGANGEN	
12 APR. 1999	
Erg. C. L. M.	

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum  
Unser Zeichen: K 2575 - hu / msl

**Konjugat zur Unterscheidung von krankhaftem und gesundem Gewebe**

Die Erfindung betrifft Konjugate zur Unterscheidung von krankhaftem und gesundem Gewebe, Verfahren zur Herstellung solcher Konjugate sowie ihre Verwendung.

In der Behandlung von krankhaftem Gewebe, z.B. von Tumoren, ist die Entfernung desselben oft ein essentieller Schritt. Hierzu ist es notwendig, daß der operierende Arzt genau erkennt, wo krankhaftes Gewebe endet und gesundes Gewebe beginnt. Dies ist allerdings oft nicht möglich. Ausläufer des krankhaften Gewebes werden daher übersehen, die dann die Basis für die erneute Entstehung des krankhaften Gewebes darstellt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem krankhaftes von gesundem Gewebe unterschieden werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, umfassend eine zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und einen Träger, wobei die Verbindung und der Träger über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung oder Enan-Brücke (Schiffsche Base) verbunden sind und die Verbindung eine Anregungswellenlänge von 630 nm oder größer und/oder 450 nm oder kleiner aufweist.

Der Ausdruck "Träger" umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die zur Anreicherung des Konjugats in einem bestimmten Gewebe, z.B. einem Tumor, einem Entzündungsherd oder in oberflächlich gelegenen kleineren Gefäßen, wie Neovaskularisationen im Bereich der Cornea (Hornhaut des Auges), geeignet sind. Bei-

spiele solcher Träger sind Proteine und Polyether. Zur Ausbildung der Säureester- oder Säureamidbindung mit der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung kann der Träger Hydroxyl- oder Amino-Gruppen aufweisen.

Die Proteine werden vorzugsweise nicht als körperfremd angesehen. Sie können in nativer Form vorliegen. In der nativen Form weisen die Proteine kein inter- und/oder intramolekulares Cross-Linking auf. Günstigerweise besitzen die Proteine ein Molekulargewicht von bis zu 100 000 Dalton, insbesondere 30 000 bis 100 000 Dalton. Ferner ist es günstig, wenn die Proteine humane Proteine sind. Beispiele der Proteine sind Albumin, Fibrinogen, Transferrin, Immunglobuline und Lipoproteine, wobei humanes Serumalbumin (HSA) bevorzugt ist. Es können auch Fragmente vorstehender Proteine verwendet werden. Ferner kann die Sequenz der Proteine bzw. der Fragmente davon Änderungen von einer oder mehreren Aminosäuren gegenüber bekannten Sequenzen der Proteine bzw. Fragmente davon aufweisen.

Beispiele der Polyether sind Polyethylenglykole, insbesondere solche mit einem Molekulargewicht von 100 bis 20 000 Dalton. Vorzugsweise sind die Polyethylenglykole an der endständigen Hydroxylgruppe mit einer C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylgruppe, insbesondere mit einer Methylgruppe, verestert oder verethert.

Ein erfindungsgemäßes Konjugat kann einen oder mehrere, insbesondere 2 bis 4, vorstehender Träger aufweisen. Liegen mehrere Träger vor, so können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Liegen mehrere Polyether vor, so werden diese günstigerweise so gewählt, daß das Molekulargewicht aller Polyether ca. 20 000 Dalton oder mehr beträgt.

Der Ausdruck "zur Fluoreszenz-fähige Verbindung" umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die zur Fluoreszenz angeregt werden können. Diese Verbindungen können auch photoaktiv sein. Die Verbindung ist über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung oder Enan-Brücke an den Träger gebunden. Zur Ausbildung dieser kann die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung eine Säuregruppe, z.B. eine

Carbon-, Sulfon-, Phosphon- oder Arson-Säuregruppe, eine Hydroxylgruppe, eine Aminogruppe oder eine Aldehydgruppe aufweisen. Es können mehrere dieser Gruppen vorliegen, die gleich oder verschieden voneinander sein können. Die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung wird bei einer Wellenlänge von 630 nm oder größer, bevorzugt 630 bis 850 nm und besonders bevorzugt 650 bis 850 nm und/oder bei einer Wellenlänge von 450 nm oder kleiner, bevorzugt 320 bis 450 nm angeregt. Diese Wellenlängen beziehen sich auf Anregungswellenlängen, die die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung im erfindungsgemäßen Konjugat aufweist; in freier Form kann ihre Anregungswellenlänge davon abweichen. Vertreter dieser Verbindungen sind Porphyrine, wie Tetrasulfophenylporphyrin (TSPP; Anregungswellenlänge 650 nm, wenn es an HSA gebunden ist), Chlorine, Bakteriochlorine, Chlorophylle, Phtalocyanine, wobei diese Verbindungen Metallionen als Zentralatom aufweisen können. Ferner sind Vertreter der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung Carboxyzimtsäure, Carboxyfluorescein, Acridincarbonsäure, wie Acridin-9-carbonsäure, Cumarsäure, wie Cumarin 343, Cumarin-3-carbonsäure und Hydroxycumarinessigsäure (Anregungswellenlänge 365 nm, wenn es an HSA gebunden ist), und Indocyaningrün (Anregungswellenlänge 805 nm, wenn es an HSA gebunden ist), sowie Derivate vorstehender Verbindungen.

Von der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung können im erfindungsgemäßen Konjugat eine oder mehrere vorhanden sein. Liegen mehrere vor, dann können sie gleich oder verschieden voneinander sein.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Konjugate sind in den Figuren 1 bis 3 dargestellt.

Erfindungsgemäße Konjugate können hergestellt werden, indem die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung mit dem Träger unter Ausbildung einer Säureester- oder Säureamid-Bindung kovalent verbunden wird. Hierzu geeignete Verfahren sowie benötigte Materialien sind dem Fachmann bekannt.

Wenn die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung eine Säuregruppe aufweist, dann

können die Konjugate hergestellt werden, indem diese Verbindung mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid zu reaktiven Succinimidylestern und diese dann mit dem Träger umgesetzt werden. Bei Konjugaten mit mehreren zur Fluoreszenz-fähigen Verbindungen kann die Herstellung der Succinimidylester gemeinsam oder getrennt erfolgen.

Die Umsetzung der zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid erfolgt in einem polaren aprotischen Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Das Mol-Verhältnis von zur Fluoreszenz-fähigen Verbindung : Carbodiimid : Hydroxysuccinimid beträgt etwa 1 : 1,5-3 : 5-10. Der gebildete Succinimidylester wird dann in einer wässrigen Pufferlösung, vorzugsweise  $\text{NaHCO}_3$ , mit dem Träger, wie Albumin, umgesetzt. Die Trägerkonzentration beträgt etwa 10 bis 70 mg/ml. Die so aktivierte Säuregruppe kann dann unter Ausbildung von Säureamid- oder Säureester-Bindungen mit OH- und NH-Gruppen des Trägers reagieren, wobei erfindungsgemäße Konjugate erhalten werden. Die Konjugate können mehrfach gereinigt werden, z.B. durch Ultrafiltration, und schließlich steril filtriert werden, worauf sie applikationsfertig sind.

Erfindungsgemäße Konjugate zeichnen sich durch eine erhöhte Halbwertszeit im Organismus aus. Des Weiteren reichern sich erfindungsgemäße Konjugate in krankhaftem Gewebe, insbesondere in Tumorgewebe, in Entzündungsherden und in oberflächlich gelegenen kleineren Gefäßen, z.B. von Neovaskularisationen im Bereich der Cornea an. Durch Licht wird die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung angeregt, wodurch krankhaftes Gewebe sichtbar gemacht werden kann, wohingegen gesundes Gewebe, in dem sich die erfindungsgemäßen Konjugate nicht anreichern, nicht sichtbar gemacht wird. Ferner erfolgt keine Störung durch die Eigenfluoreszenz des Blutes oder von Gewebe, z.B. der Leber, wodurch der optische Eindruck nicht verfälscht wird. Weiterhin weisen erfindungsgemäße Konjugate, in der die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung bei 630 nm oder größer angeregt werden kann, eine hohe Eindringtiefe auf.

**Kurze Beschreibung der Zeichnungen:**

Figur 1: zeigt die Herstellung eines Konjugates aus Acridin-9-carbonsäure und humanem Serumalbumin,

Figur 2: zeigt die Herstellung eines Konjugates aus Cumarin 343 und humanem Serumalbumin und

Figur 3: zeigt die Herstellung eines Konjugates aus Tetrasulfophenylporphin und humanem Serumalbumin.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1 Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus Acridin-9-carbonsäure und humanem Serumalbumin**

Die Struktur und die Herstellung des Konjugats sind in Figur 1 dargestellt.

Es wurden 20 mg Acridin-9-carbonsäurehydrat (A9CS) in 2 ml DMSO gelöst und etwa 100 mg N-Hydroxysuccinimid (HSI) im Molverhältnis von etwa 10/1 sowie 30 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) im Molverhältnis von etwa 1,5/1 zugegeben. Nach etwa 6 Stunden ist die Bildung des Hydroxysuccinimidylesters abgeschlossen. Nach dem Abtrennen des Dicyclohexylharnstoffs (DCHH) über einen Lösungsmittelbeständigen Filter (0,2  $\mu$ m) wird der Ester zu einer Lösung von 2 g humanem Serumalbumin (HSA), das in 10 ml Originallösung, 10 ml 0,34 M NaHCO<sub>3</sub> und 10 ml Methoxypolyethylenglykol (MPEG) gelöst ist, langsam zugegeben. Die bei der Zugabe entstehende leichte Trübung löst sich nach kurzer Zeit wieder auf. Es entsteht eine leicht gelbliche Lösung eines Konjugats aus A9CS und HSA. Die Abtrennung der im fertigen Präparat unerwünschten Begleitstoffe, wie überschüssiges DCC, HSI, nicht gebundenes A9CS, DMSO

und MPEG, erfolgt durch Ultrafiltration (Auschlußgrenze 10 kD) mit mindestens 4 Waschvorgängen.

**Beispiel 2: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus Cumarin 343 und humanem Serumalbumin**

Die Struktur und die Herstellung des Konjugates sind in Fig. 2 dargestellt.

In 2 ml DMSO wurden 20 mg Cumarin 343 (C343 = 10-Carboxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-[1]benzopyranon[6,7,8,ij]chinolizin-11-on) gelöst. Dazu wurden etwa 100 mg HSI im Molverhältnis von 10/1 und 30 mg DCC im Molverhältnis von etwa 1,5/1 zugegeben. Der Ester wurde wie in Beispiel 1 beschrieben isoliert und mit HSA umgesetzt, wobei eine intensiv gelbe Lösung eines Konjugates aus C343 und HSA erhalten wurde. Die Abtrennung von unerwünschten Begleitstoffen erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

**Beispiel 3: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus Tetra-(4-sulfophenyl)-porphin und humanem Serumalbumin**

Die Struktur des Konjugates und dessen Herstellung sind in Figur 3 dargestellt.

Tetra-(4-sulfophenyl)-porphin (TSPP) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO gelöst. Zu der klaren dunkelgrünen Lösung wurde die dreifache molare Menge an DCC und die fünffache molare Menge an HSI zugegeben. Nach etwa 3 bis 4 Stunden Reaktionszeit ist die Umsetzung zum TSPP-Succinimidylester (TSPP-SE) beendet, wobei der gebildete Di-Cyclohexylharnstoff feinkörnig abgeschieden wird. Die analytische Kontrolle erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie.

Humanes Serumalbumin (HSA, 4g, d.h. 2 Ampullen zu je 2 g in 10 ml) wurden

mit 2 x 10 ml 0,17 M NaHCO<sub>3</sub> und 20 ml Methoxypolyethylenglykol<sub>350</sub> verdünnt und in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben vorgelegt. Zu dieser HSA-Lösung wurde langsam unter ständigem Rühren vorstehende TSPP-SE-Lösung in DMSO zugefügt, wobei sich die zunächst klare Lösung durch nicht umgesetztes DCC, das in wässriger Lösung unlöslich ist, eintrübt. Nach Beendigung der Zugabe von TSPP-SE wurde das Reaktionsgemisch zur vollständigen Umsetzung 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Trübung über eine Sterifiltereinheit (Millipore, Stericup - GV, 0,22 µm Low Binding Duropore Membrane) und die niedermolekularen wasserlöslichen Komponenten (DMSO, HSI und nicht gebundenes TSPP) durch Ultrafiltration über eine Membran mit 30 kD Ausschlußgrenze (Amicon YM 30) abgetrennt. Es wurde ein erfindungsgemäßes Konjugat aus TSPP und HSA erhalten. Die Kopplungsausbeute von TSPP an HSA betrug 85 bis 90 %.

Die analytische Reinheitskontrolle erfolgte mittels HPLC unter folgenden Bedingungen:

Vorsäule: Zorbax Diol (50 x 4 mm)

Säule 1: Zorbax GF 450

Säule 2: Zorbax GF 450

Laufmittel: 0,2 M Na-citrat, pH 7,5

Fluß: 1 ml/min

Detektor 1: 280 nm (für das Protein)

Detektor 2: 420 nm (für TSPP)

**Patentansprüche**

1. Konjugat, umfassend eine zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und einen Träger, wobei die Verbindung und der Träger über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung eine Enan-Brücke verbunden sind und die Verbindung in dem Konjugat eine Anregungswellenlänge von 630 nm oder größer und/oder 450 nm oder kleiner aufweist.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Protein ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein ein nicht als körperfremd angesehenes, natives Protein ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein humanes Serumalbumin ist.
5. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Polyether ist.
6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyether ein Pölethylenglykol ist.
7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Träger vorliegen.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung eine Säuregruppe, Hydroxylgruppe, Aminogruppe oder Aldehydgruppe aufweist.

9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungswellenlänge 630 bis 850 nm beträgt.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungswellenlänge 320 bis 450 nm beträgt.
11. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung abgeleitet ist von Porphyrin, Chlorin, Bakteriochlorin, Chlorophyll, Phtalocyanin, Carboxyzimtsäure, Carboxyfluorescein, Acridinsäure, Cumarinsäure oder Indocyaningrün sowie den Derivaten davon.
12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere zur Fluoreszenz-fähige Verbindungen vorliegen.
13. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und der Träger unter Ausbildung einer Säureester oder Säureamid-Bindung kovalent verbunden werden.
14. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Unterscheidung von krankhaftem und gesundem Gewebe.

### **Zusammenfassung**

#### **Konjugat zur Unterscheidung von krankhaftem und gesundem Gewebe**

Die Erfindung betrifft Konjugate, umfassend eine zur Fluoreszenz-fähige Verbindung und einen Träger, wobei die Verbindung und der Träger über eine Säureester- oder Säureamid-Bindung verbunden sind und die Verbindung eine Anregungswellenlänge von 630 nm oder größer und/oder 450 nm oder kleiner aufweist. Ferner betrifft die Erfindung die Herstellung solcher Konjugate sowie ihre Verwendung.

Figure 1:

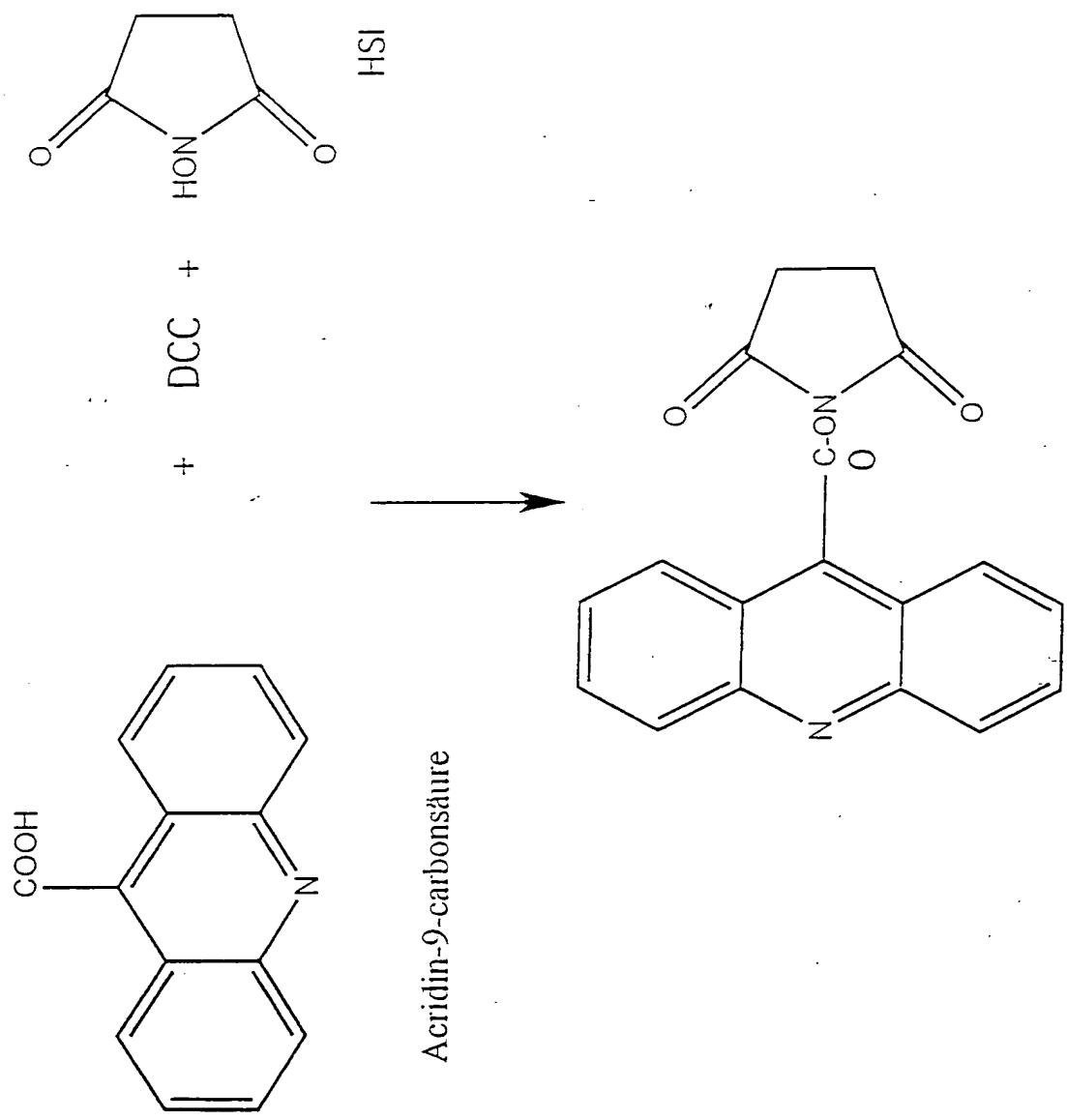
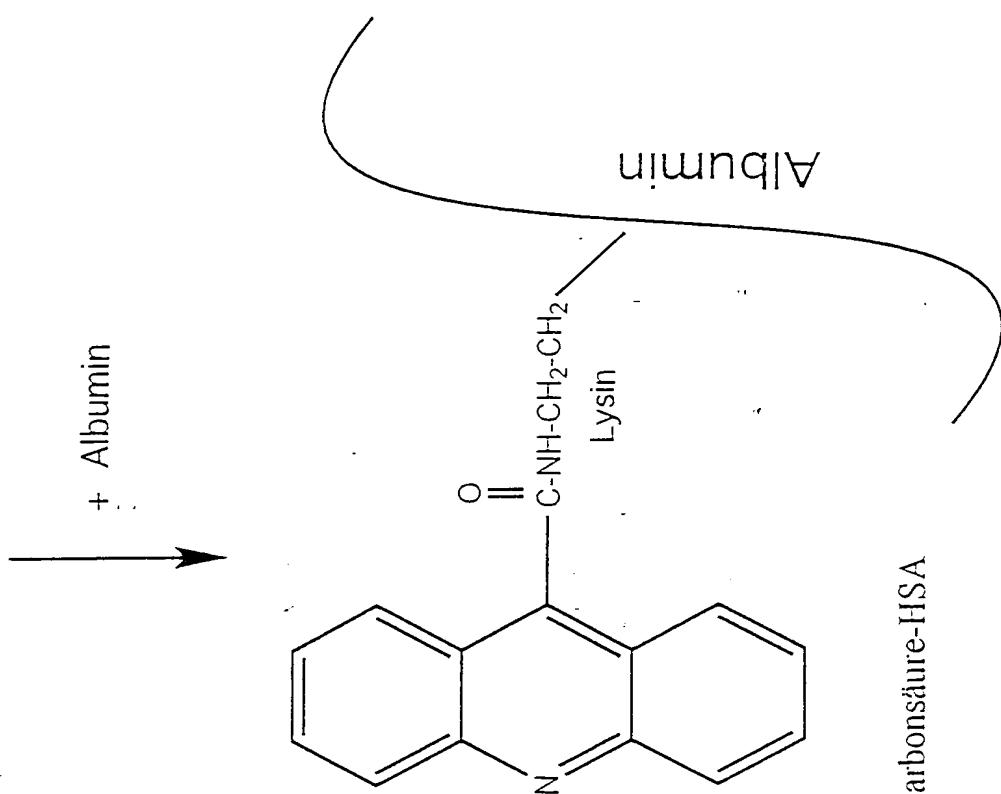


Figure 1 (Fortsetzung)



Acridin-9-carbonsäure-HSA

Figure 2:

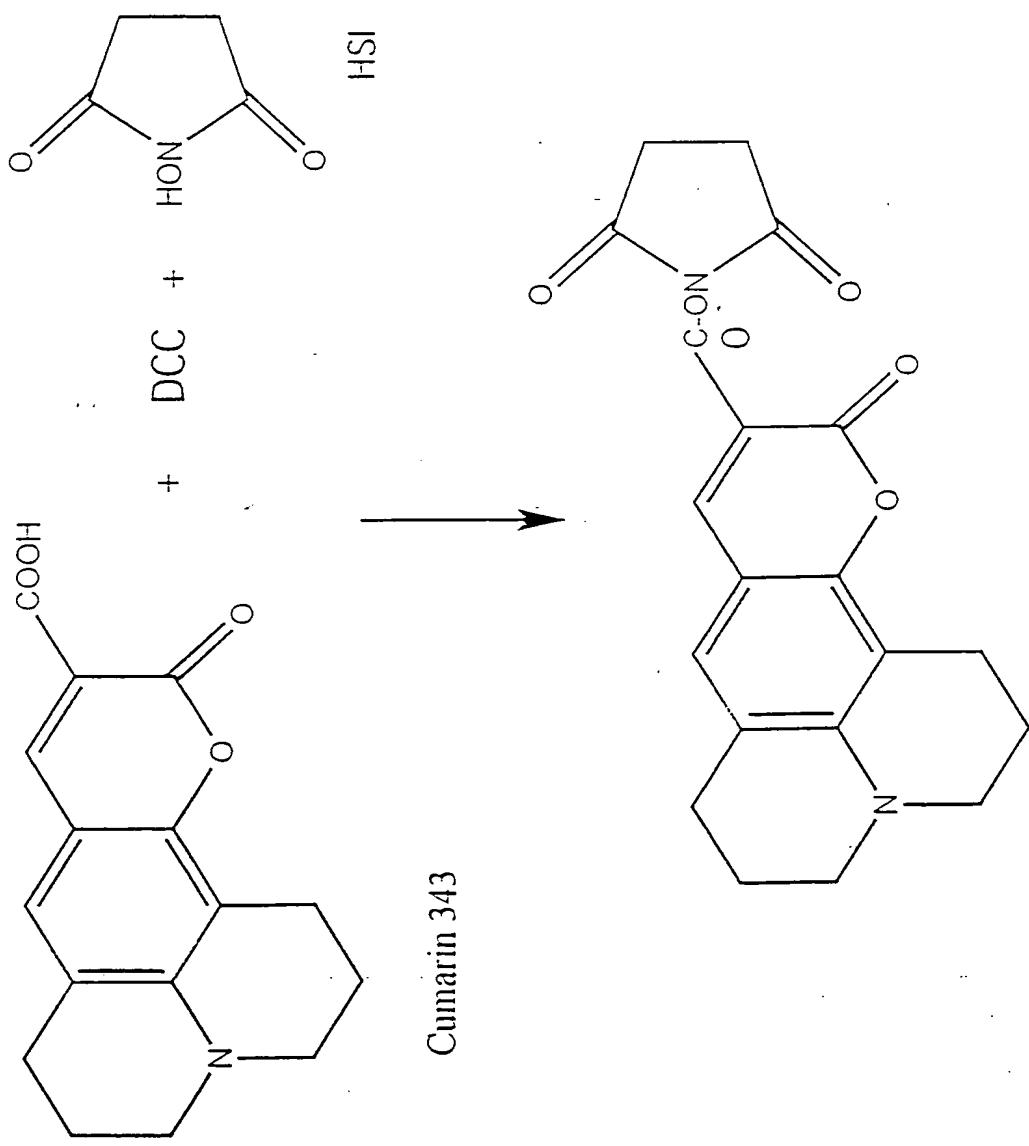
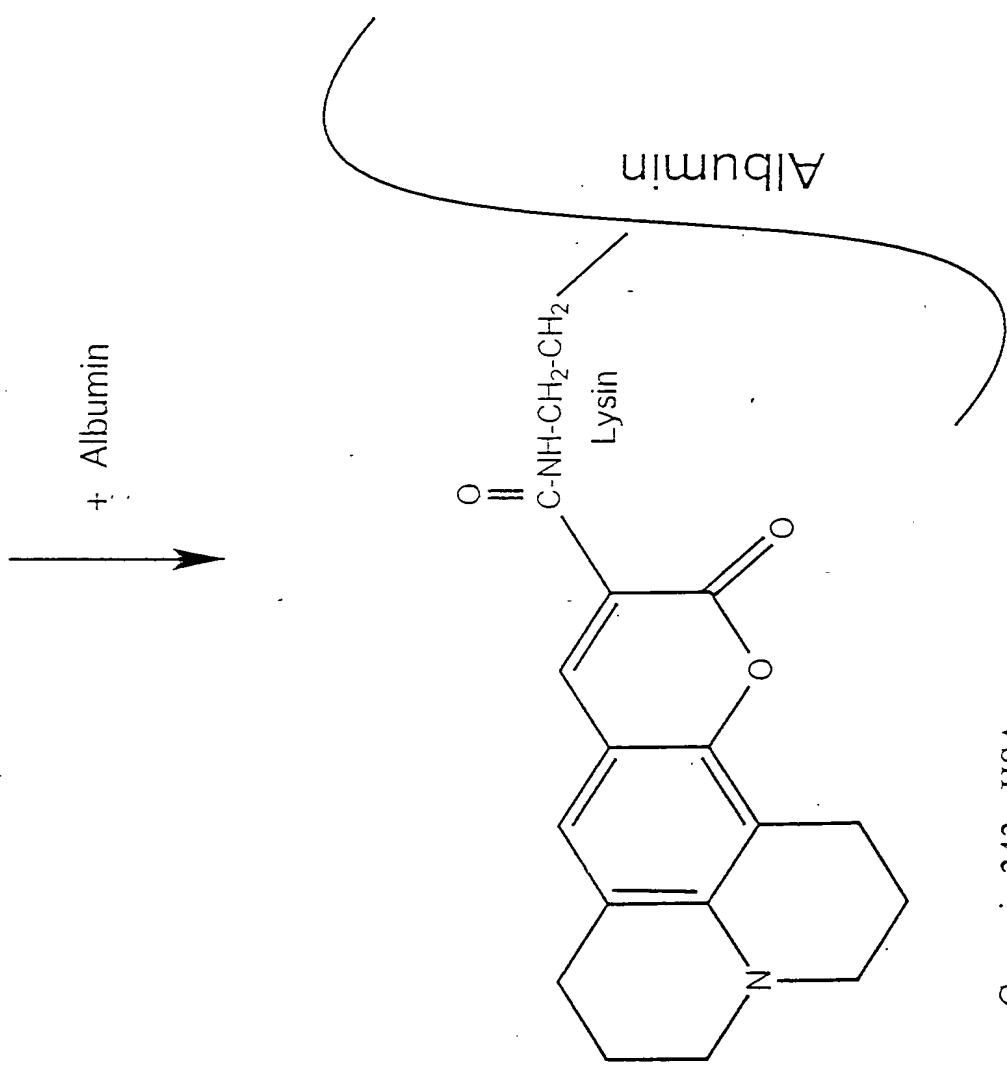
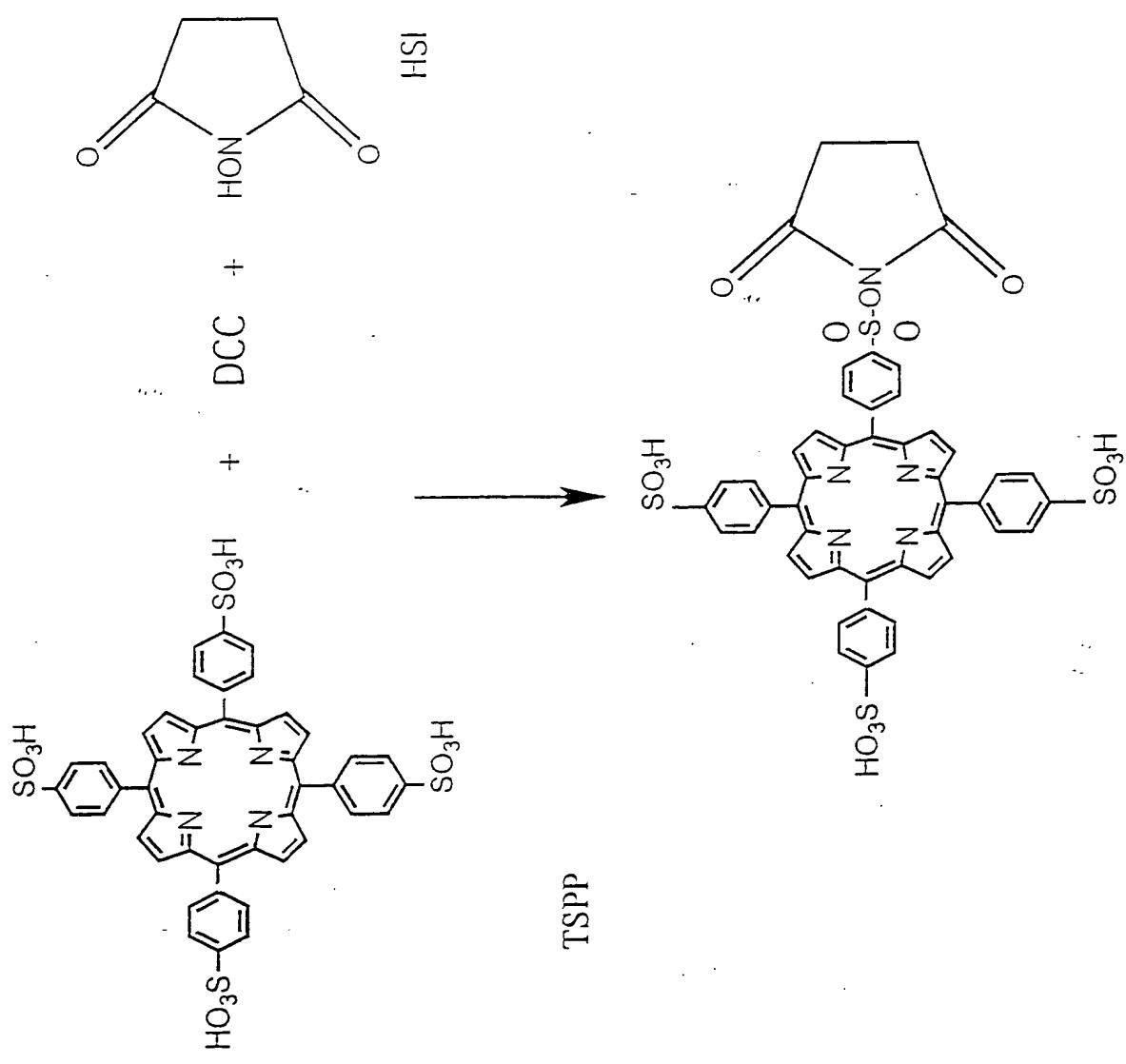


Figure 2 (Fortsetzung)

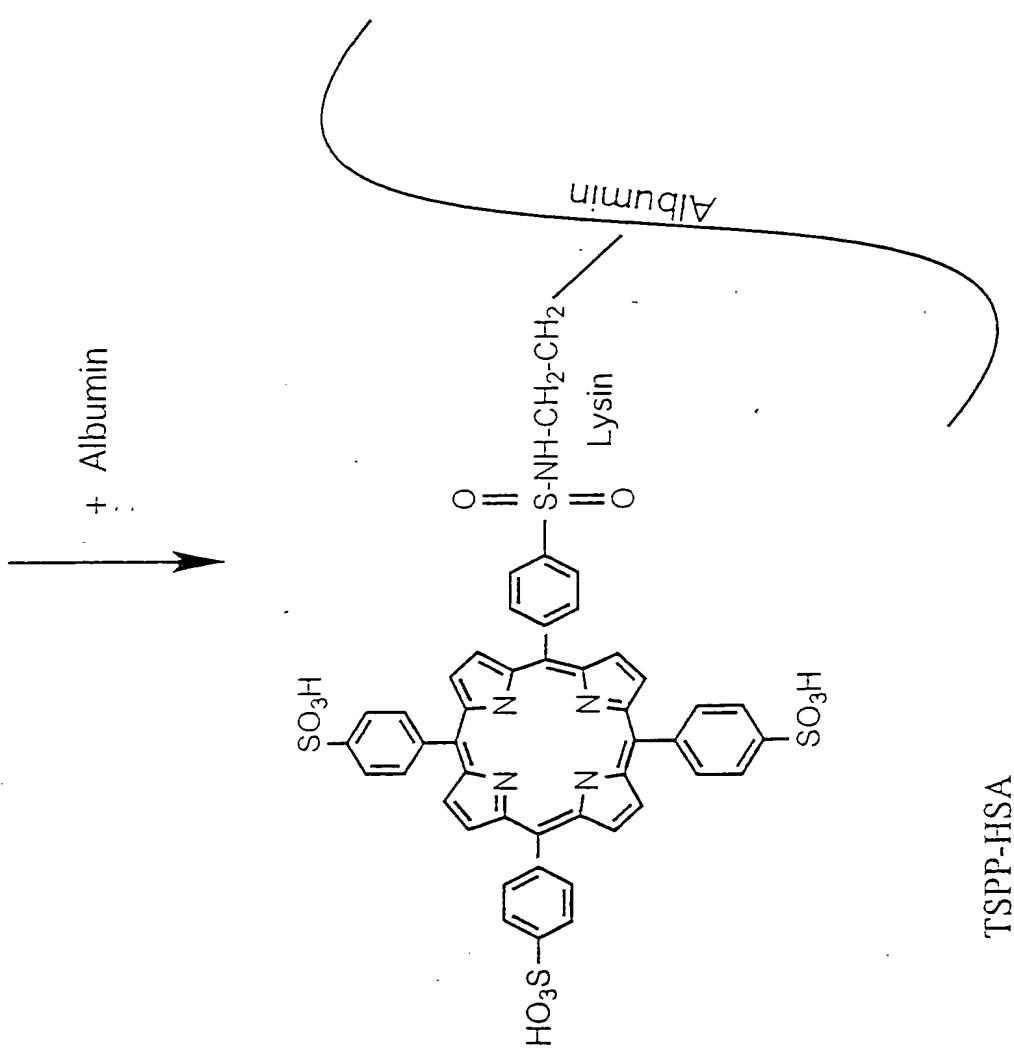


Cumarin 343 - HSA

Figure 3:



Figur 3 (Fortsetzung)



TSPP-HSA